

Diss. ETH NO. 23297

**Two-dimensional crystallization of the mouse serotonin 5-HT<sub>3A</sub>  
receptor**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Jan Steffen Harald Claudius Urs Rheinberger

Dipl. Chem., Albert-Ludwigs-University Freiburg im Breisgau

born 17.06.1986  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Gebhard F.X. Schertler  
Prof. Dr. Henning Stahlberg  
Prof. Dr. Samuel Zeeman  
Dr. Xiaodan Li

2016

## Summary

The serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor is an important component of neuronal signal transduction and belongs to the pentameric ligand-gated ion channels (pLGIC). In the past ten years several structures of protein family members were solved and the underlying mechanism of ligand binding and channel opening started to be revealed. The x-ray structure of the homopentameric mouse serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor showed for the first time the intracellular domain of mammalian pLGIC member providing some explanation on the function of this domain. However, how pLGICs get activated is still unknown.

There are two major parts of my thesis. In the first part, I have investigated the formation of two-dimensional (2D) crystals of mouse serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor for structural studies in native-like lipid environment. With a systematic approach I was able to find initial conditions for reconstituting the receptor at high density into lipid bilayers using only a few-hundred microgram of the purified protein. By analyzing the influence of major components involved in the crystallization process - protein sample, lipid property and lipid-to-protein ratio, detergent, buffer condition - I obtained ordered 2D crystals of the receptor. The most important component affecting the 2D crystallization is the protein. Using limited proteolysis of wild-type receptor, protein variants with different flexible parts could be generated. The tandem-protease treatment with trypsin and chymotrypsin provided the best results in terms of generating the first 2D crystals. The improvement of diffraction quality could only be achieved by adding conformational nanobodies. Different conformational nanobodies demonstrated significant effects on crystal packing as well as receptor stability and sample homogeneity. Receptors together with various conformational nanobodies will be very interesting to investigate receptor conformations using cryo electron microscopy single particle analysis.

In the second part of my thesis, I summarize 2D and 3D crystallization experiments of rhodopsin and rhodopsin-G protein complex for XFEL studies. I have participated in 3D crystal sample preparation of native bovine rhodopsin for XFEL experiments at LCLS, Stanford, USA, resulting in nanometer-sized rhodopsin crystals diffracting to 4-5 Å at the XFEL. This is an important step towards pump-probe experiments investigating the structural changes of rhodopsin in the activation process. Although the structure of rhodopsin was the first to be solved of a prototype G protein coupled receptor (GPCR), the rhodopsin-transducin complex was not crystallizable, due to instability of the complex in detergent solution. Using a constitutively active rhodopsin mutant, I have tried to obtain 2D crystals of the rhodopsin-

transducin complex following two paths: 1) crystallization of purified complex and 2) adding of G-protein to 2D crystals of rhodopsin. To my knowledge, I obtained for the first time crystalline arrays of a recombinantly expressed rhodopsin or GPCR in general and could prove binding of transducin after light activation, which was not possible for 2D crystals of native bovine rhodopsin. Crystal quality and incompleteness of complex formation prevented further investigations.

## **Zusammenfassung**

Der Serotoninrezeptor 5-HT<sub>3</sub> ist ein wichtiger Bestandteil der neuronalen Signalübertragung und gehört zur Proteinfamilie der pentameren ligandenabhängigen Ionenkanälen. In den vergangenen zehn Jahren wurden mehrere Strukturen von Mitgliedern dieser Proteinfamilie gelöst, was zum Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus der Ligandenbindung sowie der Öffnung der Kanäle beigetragen hat. Die Struktur des mäuseischen homopentameren Serotoninrezeptors 5-HT<sub>3A</sub> zeigte erstmals die intrazelluläre Domäne eines Säugetierrezeptors und gab erste Aufschlüsse über deren Funktion. Die Aktivierung der pentameren Rezeptoren ist jedoch weiterhin unbekannt.

Meine Arbeit besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil untersuchte ich die Herstellung von zwei-dimensionalen Kristallen des mäuseischen Serotoninrezeptors 5-HT<sub>3A</sub> für strukturelle Untersuchungen in einer Lipid-Umgebung vergleichbar mit der natürlichen. Mit nur wenige hundert Mikrogramm gereinigtem Protein und einem systematischen Ansatz war ich in der Lage erste Bedingungen für eine dichte Packung des Rezeptors in Lipiddoppelschichten zu erhalten. Durch die Analyse der wichtigsten Komponenten - Protein, Lipideigenschaften und Verhältnis von Lipid zu Protein, Detergenz, Bufferbedingung - konnten ich die Rekonstitution verbessern und geordnete 2D Kristalle erhalten. Den größten Einfluss auf die Kristallisation hatte das Protein. Durch limitierte Proteolyse des Wildtyprezeptors war es möglich Proteinvarianten mit unterschiedlichen flexiblen Regionen zu erstellen. Der doppelte Proteinverdau mit Trypsin und Chymotrypsin lieferte die besten Ergebnisse in der Erzeugung von ersten 2D Kristallen. Eine weitere Verbesserung der Kristallstreuung war nur durch den Einsatz von konformationellen Nanobodies möglich. Dabei zeigten die verschiedenen Nanobodies signifikante Unterschiede bezüglich ihres Effektes sowohl auf die Kristallpackung als auch auf die Rezeptorstabilität und -homogenität. Die Kombination aus Rezeptoren und verschiedenen konformationellen Nanobodies ist für die Untersuchung verschiedener Rezeptorkonformationen mittels Einzel-Partikel Analyse am Kryo-Electronenmikroskop von Interesse.

Im zweiten Teil meiner Arbeit werden die Ergebnisse aus 2D und 3D Kristallisationsexperimenten von Rhodopsin und des Rhodopsin-G-Protein Komplexes für Messungen am XFEL, LCLS, Stanford, USA, behandelt. Meine Beteiligung an der Vorbereitung von 3D Kristallen des nativen Rinderrhodopsins resultierte in Nanokristallen, die am XFEL mit einer Auflösung von bis zu 4-5 Å streuten. Dies war ein wichtiger Schritt in Richtung der strukturellen Untersuchung des Aktivierungsprozesses von Rhodopsin mittels

„pump-probe“ Experimenten. Obwohl die Struktur von Rhodopsin die erste eines prototypischen GPCR war, konnten der Rhodopsin-Transducin Komplex auf Grund der Instabilität in Detergenzlösung bisher nicht kristallisiert werden. Mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Mutante von Rhodopsin versuchte ich 2D Kristalle des Rhodopsin-Transducin Komplexes auf zwei Weisen zu erhalten: Auf der einen Seite die Kristallisation des gereinigten Komplexes und auf der anderen Seite das Hinzufügen des G-Proteins zu 2D Kristallen von Rhodopsin. Meines Wissens nach war es mir möglich, die ersten kristallinen Anordnungen eines rekombinant exprimierten Rhodopsins oder GPCRs zu erhalten und ich konnte die Bindung von Transducin nach der Lichtaktivierung der Kristalle nachweisen. Dies war zuvor mit den Kristallen des nativen Rinderrhodopsins nicht möglich. Sowohl die Qualität der Kristalle als auch die nicht vollständige Bildung der Komplexes verhinderten weitere Untersuchungen.